บทคัดย่อ

การสำรวจโรคซอล์คบรูดจากภาคสนามทำให้สามารถแยกเชื้อราสาเหตุของโรคจาก 3 จังหวัด คือ จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดนครราชสีมา และจังหวัดปทุมธานี ในห้องปฏิบัติการ เส้นใยราเจริญได้ดีบนอาหาร Sabouraud dextrose agar ที่ 30°ซ ในที่มืดมีออกซิเจน และ pH 6.5

ผลการคัดกรองเบื้องต้นสารต้านเชื้อราจาก*Bacillus* 30 ไอโซเลทจากท้องถิ่นโดยวิธี agar diffusion พบว่ามี 9 ชนิดที่มีประสิทธิภาพในการชะลอการเจริญของเส้นใยรา ได้นำ *Bacillus* ที่มีประสิทธิภาพสูง 5 ชนิด คือ *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* และ *B. thuringiensis* 65 ที่บ่มด้วยเวลาตั้งแต่ 6, 12, 24, 48, 72, 120 และ 168 ชม.ไปเลี้ยงร่วมเป็นเวลา 48 ชม. กับเส้นใยราอายุ 1 วัน พบว่า โดยทั่วไป culture broth จากแบคทีเรียที่บ่มนาน 24 ชม. มีประสิทธิภาพสูงสุด รองลงมาคือ culture broth จากแบคทีเรียที่บ่มที่ 168, 12, 6, 120, 72 และ 48 ชม. ตามลำดับ ส่วนที่เป็น intact cells ชะลอการเจริญของเส้นใยราได้ดีกว่าส่วนที่เป็น extracellular secretion (ยกเว้น *B. subtilis* และ *B. thuringiensis* 65) แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถชะลอการเจริญของเส้นใยราที่แยกได้จากจังหวัดปทุมธานีได้ดีกว่าจากจังหวัดเชียงใหม่และจังหวัดนครราชสีมาตามลำดับ

การทดลองพบว่า type strain ของ *B. licheniformis* และ *B. stearothermophilus* ชนิดเดียวกันแต่ไม่ได้แยกจากตัวอ่อนผึ้งที่ตายด้วยโรคซอล์คบรูดก็สามารถชะลอการเจริญของเส้นใยราได้ แต่มักมีประสิทธิภาพต่ำกว่าพวกที่แยกจากตัวอ่อนผึ้งติดโรคและความเข้มข้นของแบคทีเรียที่ 10^4 เซลล์/มล. มีประสิทธิภาพสูงกว่า 10^8 เซลล์/มล.

ผลการศึกษาพบว่า *B. thuringiensis* ทั้ง 3 สายพันธุ์คือ *Bt.* 65, *Bt. ostriniae* และ *Bt. pakistani* เมื่อถูกชักนำให้สร้างเอนไซม์ไคติเนสด้วยคอลลอยดัล ไคติน 0.1-1% มีประสิทธิภาพในการชะลอการเจริญของเส้นใยราได้ดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) มากกว่ากลุ่มของแบคทีเรียที่ไม่ถูกชักนำให้สร้างเอนไซม์ไคติเนสด้วยคอลลอยดัล ไคติน และแบคทีเรียทั้ง 5 ชนิดสามารถชะลอการเจริญของเส้นใยราที่มีอายุน้อยได้ดีกว่าราที่มีอายุมาก

ผลการตรวจความผิดปกติทางสัณฐานวิทยาของเชื้อราที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า แบคทีเรียเข้าล้อมรอบเส้นใยราภายใน 6 ชม. จากนั้นแบคทีเรียมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น เริ่มพบแวคูโอลจำนวนมากในเส้นใยราและเมื่อเลี้ยงร่วมกันนาน 48 ชม. พบว่าไซโตพลาสมไหลออกจากเส้นใยรา ทำให้เส้นใยมีรูปร่างผิดปกติ หดสั้น และเสียรูปมากขึ้นตามระยะเวลาของการบ่มร่วมกัน

แม้ว่าเส้นใยราจาก 3 จังหวัดจะตอบสนองต่อสารต้านเชื้อราจากแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการตรวจสัณฐานวิทยาของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ไม่สามารถตรวจพบความแตกต่างของราจาก 3 จังหวัด แอสโคคาร์ปของรามีรูปร่างกลม ขนาดเพิ่มขึ้นตามอายุ มีเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 45-165 ไมครอน และแอสไซมีขนาด 9-25 ไมครอน แอสโคสปอร์ของราทั้ง 3 ไอโซเลทมีรูปร่างยาวรี ขนาดกว้าง 0.6-0.8 ไมครอน และยาว 1.0-1.3 ไมครอน เมื่อนำไปตรวจความแตกต่างของสายพันธุ์โดยวิธีไอโซไซมด้วยชุดสำเร็จ API-ZYM test kit ก็ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของราจาก 3 จังหวัด

Abstract

Field survey for honey bee chalkbrood disease could obtained 3 isolates from Chiang-Mai, Nakorn-Ratchaseema and Prathum-Thanee provinces. Mycelium could grow well on Sabouraud dextrose agar at 30^{o}C, in dark, with oxygen at pH 6.5

Preliminary screening on the antifungal activity of 30 local isolates of *Bacillus* found 9 species could retard the growth of mycelium. Culture broth from 6, 12, 24, 48, 72, 120 and 168 h. of *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis*, and *B. thuringiensis* 65 the most effective bacteria, were coinoculated for 48 h. with 1 day old mycelium. Result showed that culture broth from 24 h. provided the highest efficiency to retard the growth of mycelium, followed with those form 168, 12, 6, 120, 72 and 48 h. consequently. Most intact cell fraction provided higher efficiency than those from extracellular secretion except those from *B. subtilis* and *B. thuringiensis* 65. Most bacteria could retard the growth of mycelium from Prathum-Thanee than those from Chiang-Mai and Nakorn-Ratchaseema

The type strain of same species of *B. licheniformis* and *B. staerothermophilus* (not isolated from diseased-honey bee) could also retard the grotwh of mycelium but with less efficiency than those isolated from diseased-bees. Bacteria at the concentration of 10^{4} cells/ml could retard mycelium growth better than those of 10^{8} cells/ml.

Induction of chitinase production by 0.1-1% colloidal chitin *Bt.* 65, *Bt. ostriniae* and *Bt. pakistani* could retard the mycelium growth better than those of non-chitinase inducing *Bt.* of same strain. The 5 potential bacteria could retard young mycelium growth better than the older.

Microscopy observation revealed the adherance of bacteria to the mycelium after 6 h of coinoculation. They multiplied in situ, colonized the mycelium. Vacuolation was found prior to cytolysis and the shrunken of mycelium. Thus, the abnormalities of mycelium increasing with coinoculation time.

Despite the 3 isolates of fungi responsed differently to the antifungal activities from the studied *Bacillus*, morphological study under microscope could not distiguish the differences of fungi from 3 different provinces. The round shaped-ascocarps possessed diameter ranged from 45-165 micron depending on their age. The round shaped-asci ranged from 9-25 micron. The oval shaped-ascospores were 0.6-0.8 micron in width and 1.0-1.3 micron in length. The isozyme by API-ZYM test kit could not distinguish the differences of the 3 isolates of fungi.